

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-511937

(43) 公表日 平成8年(1996)12月17日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 0 1 K 67/027		8502-2B	A 0 1 K 67/027	
C 0 7 K 16/10		8517-4H	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 N 5/06		8310-2J	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/531		8310-2J	33/576	B
33/576		8310-2J		Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-500728  
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)5月13日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)11月16日  
(86) 国際出願番号 PCT/US94/05410  
(87) 国際公開番号 WO94/27556  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)12月8日  
(31) 優先権主張番号 061,706  
(32) 優先日 1993年5月17日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 106951  
(32) 優先日 1993年9月8日  
(33) 優先権主張国 イスラエル (IL)

(71) 出願人 イエダ リサーチ アンド デベロップメ  
ント カンパニー リミテッド  
イスラエル国 76 100, レホボト, ザ  
ワイズマン インスチテュート オブ サ  
イエンス (番地なし)  
(72) 発明者 レイスナー ヤイアー  
イスラエル国テル アビブ, マザル ダギ  
ン ストリート 4  
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝炎ウイルス感染症の動物モデル

(57) 【要約】

ヒト肝炎ウイルス (HV) 感染症のモデルとして有用な非ヒトキメラ動物において、異種細胞を有する哺乳動物M5からなり、哺乳動物M5は、造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導され、この場合、1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレバレーションまたはT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞もしくは骨髓プレバレーションの一方または両者であり、哺乳動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレバレーションもしくはHVでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレバレーションであり、M5哺乳動物内の肝臓組織プレバレーションはHVに感染している非ヒト動物。



FIG. 1A

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. ヒト肝炎ウイルス（H V）感染症のモデルとして有用な非ヒトキメラ動物において、異種細胞を有する哺乳動物M 5 からなり、哺乳動物M 5 は、造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M 2 に由来する造血細胞および哺乳動物M 3 からの肝臓組織を移植された哺乳動物M 1 から誘導され、この場合、1種または2種以上の哺乳動物M 2 および哺乳動物M 3 は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M 2 から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションまたはT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞もしくは骨髄プレパレーションの一方または両者であり、哺乳動物M 3 から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレパレーションもしくはH Vでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレパレーションであり、M 5 哺乳動物内の肝臓組織プレパレーションはH Vによって感染している非ヒト動物。

2. 上記哺乳動物M 1 の造血細胞は全身放射線照射（T B I）によって実質的に破壊される「請求項1」に記載の非ヒト動物。

3. 放射線照射は分割全身放射線照射（T B I）である「請求項2」に記載の非ヒト動物。

4. 少なくとも1種の哺乳動物M 2 はT細胞欠損動物である「請求項1～3」に記載の非ヒト動物。

5. T細胞欠損哺乳動物M 2 は、重症複合免疫不全症（S C I D）動物である「請求項4」に記載の非ヒト動物。

6. 上記哺乳動物M 2 は、S C I Dマウスである「請求項5」に記載の非ヒト動物。

7. 造血細胞プレパレーションはT細胞枯渇骨髄プレパレーションである「請求項1」に記載の非ヒト動物。

8. 幹細胞プレパレーションは上記M 2 哺乳動物の末梢血から得られるT細胞枯渇幹細胞プレパレーションである「請求項1」に記載の非ヒト動物。

9. 上記M 2 哺乳動物は幹細胞の末梢血液系への遊走を導く処置を受けている

ヒトである「請求項8」に記載の非ヒト動物。

癌患者から得るとすることもできる。ヒトの場合には、幹細胞濃縮プレパレーション。

10. 上記処置は顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の上記ヒトへの投与からなる「請求項9」に記載の非ヒト動物。

11. 上記M3哺乳動物はHBVまたはHCV感染哺乳動物である「請求項1」に記載の非ヒト動物。

12. HBVまたはHCV感染哺乳動物はヒト肝炎患者である「請求項11」に記載の非ヒト動物。

13. 上記M3哺乳動物は非-HV感染哺乳動物であり、その肝臓組織はM1哺乳動物への移植の前にインビトロでHVに感染させる「請求項1」に記載の非ヒト動物。

14. 上記M3哺乳動物は非-HV感染哺乳動物であり、移植後に得られたM4哺乳動物はHVを接種される「請求項1」に記載の非ヒト動物。

15. 1種または2種以上の哺乳動物M2からの造血細胞はSCID哺乳動物からの造血細胞およびT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞または骨髄プレパレーションからなる「請求項1」に記載の非ヒト動物。

16. 1種または2種以上のM2哺乳動物からの造血細胞はSCID哺乳動物からの造血細胞およびT細胞枯渇ヒト幹細胞またはヒト骨髄プレパレーションからなる「請求項1」に記載の非ヒト動物。

17. 薬剤または薬剤の組合せについてHV感染症の治療剤としての可能性を評価する方法において、

(a) 異種細胞を有する哺乳動物M5であって、哺乳動物M5は、造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導され、この場合1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションまたはT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞もしくは骨髄プレパレーションの一方または両者であり、哺乳

動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレパレーションまたはHVでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレパレーションであり、M5哺乳動物内の肝臓組織プレパレーションはHVに感染しているM5哺乳動物を得、

(b) 上述の薬剤または薬剤の組合せを上記哺乳動物M5に投与し、ついで

(c) 上記M5哺乳動物においてHV感染の伝播の予防または生理学的症状の減弱における上述の薬剤または薬剤の組合せの有効性を評価すること、  
からなる方法。

18. 抗-HV予防的処置の有効性を評価するためのモデルとして有用な非ヒトキメラにおいて、哺乳動物M4からなり、哺乳動物M4は、造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの非-HV感染肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導され、この場合1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションまたはT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞もしくは骨髄プレパレーションの一方または両者であり、哺乳動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレパレーションもしくはHVでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレパレーションである動物。

19. HV感染の予防における薬剤または薬剤の組合せ可能性を評価する方法において、

(a) 造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの非-HV感染肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導され、この場合1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションまたはT細胞枯渇哺乳動物の幹細胞もしくは骨髄プレパレーションの一方または両者であり、哺乳動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレパレーションもしくはHVでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレパレーションである哺乳動物M4を得、

- (b) 上述の薬剤または薬剤の組合せを上記哺乳動物M4に投与し,
  - (c) 上記哺乳動物M4にHVを感染させ, ついで
  - (d) 上記肝組織の一次的HV感染の予防における上述の薬剤または薬剤の組合せの有効性を評価すること,
- からなる方法.

20. 抗-HV免疫細胞または抗体を得る方法において,

(a) 異種細胞を有する非ヒト哺乳動物M5であって, 哺乳動物M5は, 造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導され, この場合, 1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり, 1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞枯渇ヒト幹細胞もしくは骨髓プレパレーションであって所望によりT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションと組み合わせてもよく, 哺乳動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織プレパレーションもしくはHVでの感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織プレパレーションであり, M5哺乳動物内の肝臓組織プレパレーションはHVによって感染している哺乳動物M5を得,

- (b) 上記M5哺乳動物の血液から免疫細胞または抗体を回収し, ついで
  - (c) 抗-HV反応性を有する免疫細胞または抗体を選択すること,
- からなる方法.

21. 「請求項20」に記載の方法によって得られる抗体.

22. 選択された免疫細胞は抗-HV抗体産生B細胞であり, 方法はさらに上記B細胞を不死化する工程からなる「請求項20」に記載の方法.

23. 「請求項22」により得られる不死化抗-HV抗体産生細胞.

24. 選択される免疫細胞は, 細胞傷害性T細胞である「請求項20」に記載の方法.

25. 「請求項24」により得られる細胞傷害性T細胞.

## 【発明の詳細な説明】

## 肝炎ウイルス感染症の動物モデル

## 発明の分野

本出願は、ヒトにおける肝炎ウイルス（H V）感染、とくにB型肝炎ウイルス（H B V）およびC型肝炎ウイルス（H C V）感染症の動物モデルに関する。

## 従来技術

以下の記述に関連があると考えられる従来技術および引用文献の一覧表は、次の通りである。

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.  
Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B  
viral hepatitis genome. 1989. Science 244: 359-362.
2. Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH,  
Miyamura T, Dienstag JL, Alter HJ, Stevenes CE, Tegtmeier GE,  
Bonnino F, Colombo M, Lee W-S, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby  
LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. An assay for circulating  
antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B  
hepatitis.  
Science 244: 362-364.
3. Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G.  
1992. Immunity in hepatitis C infection. J. Infec. Dis. 165: 438-  
443.
4. Shimizu YK, Weiner J, Rosenblatt J, Wong DC, Shapiro M, Popkin T,  
Houghton M, Alter HJ, Purcell RH. 1990. Early events in hepatitis  
C virus infection in chimpanzees. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:  
6441-6444.
5. Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. 1992.  
Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in

- a human T cell line. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 89: 5477-5481.
6. Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H. 1993. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 90: 6037-6041.
  7. Nakamura T, Good RA, Yasumizu R, Inoue S, Oo MM, Hamashima Y, Ikehara S. 1986. Successful liver allografts in mice by combination with allogeneic bone marrow transplantation. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 83: 4529-45326.
  8. Bosma MJ, Carroll AM. 1991. The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. Annu.Rev.Immunol. 9:323-350.
  9. Soriano HE, Adams RM, Darlington G, Finegold M, Steffen DL, Ledley FD. 1992. Retroviral transduction of human hepatocytes and orthotopic engraftment in SCID mice after hepatocellular transplantation. Trans.Proc. 24: 3020-3021.
  10. Aldrovandi GM, Feuer G, Gao L, Jamieson B, Kristeva M, Chen ISY, Zack JA. 1993. The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection. Nature 363: 732-736.
  11. 欧州公開特許出願, 公告第438053号.
  12. 欧州公開特許出願, 公告第517199号.

上記刊行物のここでの引用は従来技術の理解を可能にするために掲げられている。この引用は、しかしながら、この技術が添付の請求の範囲に定義された本発明の特許性に何らかの意味で関連することの指示と解釈すべきではない。

上記刊行物は上掲の一覧表中の番号を示すことによって本明細書中にその関連部分を示す。

#### 発明の背景

ウイルス肝炎の原因としては、5種類の異なるウイルスが同定されている。これらには、A、B、C、DおよびE型肝炎ウイルスが包含される。これらの中で最も重篤な感染を引き起こすウイルスはB型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HVC)である。

A型肝炎ウイルスは単一の血清型を有し、自己限定急性肝炎を生じる。人口の大部分、ほぼ50%は血清中にA型肝炎抗体を有し、疾患には多分免疫性であると思われる。A型肝炎ウイルスによる感染が慢性疾患に進行することはない。

HBVは急性および慢性肝炎の両者に関連する。この疾患はアジアにおいては風土病であり、合衆国およびヨーロッパにおける有病率も増加しつつある。重大な罹患率と高い死亡率を生じる慢性肝疾患は、感染個体の1~10%における感染続発症である。HBV感染はまた、原発性肝癌の発症と相関する。

HCVは最近、非経口的に伝播する非-A非-B肝炎の主要な病原体であることが示された<sup>(1)</sup>。世界の人口の0.5~1%がHCVに感染していると評価され、一部の開発途上国での有病率は40%にも達するという。しかも、新たに感染した患者の40~60%が持続性HCV感染症に進展し<sup>(2)</sup>、急性の劇症肝炎および多様な慢性の肝疾患（肝硬変、慢性活動型肝炎および場合により肝細胞癌を含む）を発症する危険がある。

D型肝炎ウイルス（「デルタウイルス」）は活動型HBV感染の存在下に肝臓にのみ感染できる欠陥RNAウイルスである。E型肝炎ウイルスは単一鎖RNAウイルスと思われる。E型肝炎ウイルスによる感染が慢性肝疾患に進行することは知られていない。

HBVおよびHCVは同定され特性が明らかにされているが、新しい抗ウイルス戦略の展開は、適当で、簡単で、かつ安価な動物モデル系のないことが著しい妨げになっている。

現在では、HBVおよびHCVの生物学的アッセイは、高価で数に限りのあるチンパンジーへの実験的接種に限定されている<sup>(3,4)</sup>。さらに、HCVの増殖のためのインビトロ系はマウスレトロウイルス感染ヒトT細胞系にHPB-Ma<sup>(5)</sup>およびMolt 4-Ma<sup>(6)</sup>として開発され、これらの内部でHCVの複製が達成されている。

最近、いくつかの研究において、ヒト固形臓器たとえば胎児胸腺または胎児肝臓ならびに数種の型の腫瘍のSCIDマウスの腎臓莢膜下への移植に成功したことが明らかにされている<sup>(7)</sup>。さらに、他の臓器たとえばリンパ節および骨髓骨片の移植ならびに臓器の他部位（すなわち、皮下および腹膜）への生着も報告さ



れている。

SCIDマウス突然変異体は、ヒト細胞の体内移植、すなわち単一肝細胞移植を支持し<sup>(8,9)</sup>、またヒト感染疾患、すなわちHIV-1感染のモデルとしても使用された<sup>(10)</sup>。

致死線量の放射線照射が行われたマウスをSCIDマウスからの骨髄で放射線保護すると、顕著な免疫不全を生じ、ヒト末梢血リンパ球(PBL)の移植を長期間にわたって支持することが開示されている<sup>(11)</sup>。非造血系起源のヒト移植体が、これらのキメラ動物の腎臓莢膜下への移植後、受容され長時間にわたって支持されることも開示された<sup>(12)</sup>。

#### 発明の一般的説明

本発明の目的は便利なHIV感染の非ヒト動物モデルを提供することにある。

本発明の目的はさらに、上記非ヒト動物モデルを用いるHIV感染症の処置および予防のための予防剤および治療剤の評価方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、ヒト造血細胞および移植前または移植後のいずれかにHIVで感染させるヒト肝臓組織を移植したキメラ非ヒト哺乳動物を用いる、抗-HIV異種抗体またはT細胞、とくにヒトモノクローナル抗体および細胞傷害性T細胞の製造方法を提供する。

本発明は、その第一の態様により、異種細胞を有する哺乳動物M5からなる、ヒトHIV感染症のモデルとして有用な非ヒトキメラ動物を提供する。この場合、哺乳動物M5は、造血細胞が実質的に破壊されるように処置されついで1種または2種以上の哺乳動物M2に由来する造血細胞および哺乳動物M3からの肝臓組織を移植された哺乳動物M1から誘導される。この場合、1種または2種以上の哺乳動物M2および哺乳動物M3は同種または異種であり、1種または2種以上の哺乳動物M2から移植される造血細胞はT細胞欠損哺乳動物からの造血細胞ブレパレーションまたはT細胞枯渴哺乳動物の幹細胞もしくは骨髄ブレパレーションの一方または両者であり、哺乳動物M3から移植される肝臓組織はヒト肝臓組織ブレパレーションまたはHIVによる感染が可能な非ヒト哺乳動物からの肝臓組織ブレパレーションであり、M5哺乳動物内の肝臓組織ブレパレーションはHIVに感染している。

M1哺乳動物は通常マウスまたはラットであるが、M1哺乳動物はさらに高等な非ヒト哺乳動物たとえばキヌゲザルのような霊長類であってもよい。

上記M1哺乳動物からM5哺乳動物を得るためには、M1哺乳動物をまずその造血系を実質的に破壊するような方法で処置する。「実質的に破壊する」の語は処置後に生存する造血細胞の数がM2哺乳動物からの移植がなくては動物の免疫保護に不十分であることを意味するものと理解すべきである。造血細胞を実質的に破壊する意図での処置後には、このような細胞の一部が生存しても、その数はその動物が正常の実験室条件では生存できない程度に少ない。

造血細胞を実質的に破壊する意図での処置は、たとえば、分割線量の全身放射線照射(TBI)とすることができる。造血系の破壊に有効なTBIとしては通常、蓄積線量4~50Gy(1Gy=100rad)が必要である。マウスの場合には、照射はたとえば、日1に4Gyついで3日後に9~15Gyである。ラットやキヌゲザルにおいても同程度の線量が造血細胞の破壊に有効であることが見出された。

M2哺乳動物はM1哺乳動物と同種でも異種でもよい。原理的には、任意のT細胞欠損哺乳動物が造血細胞移植のドナーとして使用できる。M2ドナーの例としては、重症複合免疫不全症(SCID)マウスまたは他の哺乳動物種もしくは属からのSCID動物がある。この場合に移植される造血細胞プレパレーションには骨髄プレパレーションが適している。

M2哺乳動物から誘導される移植造血細胞はまた、霊長類たとえばサルまたはヒトのようなドナーM2哺乳動物から得られるT細胞枯渇造血幹細胞プレパレーションとすることもできる。ヒトの場合には、幹細胞濃縮プレパレーションはたとえば、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)で前処置されたドナーの末梢血または幹細胞の末梢への遊走を生じることが明らかな化学療法を受けている癌患者から得ることができる。このようなドナーから血液プレパレーションを取り出したのち、このプレパレーションには通常、それから各種血液成分を除去し、T細胞を枯渇させるための処置が行われる。T細胞の枯渇には、M2由来の造血細胞プレパレーションをCD34抗原を提示する細胞(CD34<sup>+</sup>細胞)の濃縮を意図した処置に付することができる。上述の幹細胞濃縮、T細胞枯渇プレパレーションはそれぞれドナーから採取後直接使用することも可能であり、また1回もしくは

複数回インビトロで継代培養した細胞プレパレーションとすることもできる。

移植する造血細胞はまたT細胞枯渇骨髄プレパレーションであってもよい。

M1哺乳動物にはまた、T細胞欠損哺乳動物からの造血細胞プレパレーションおよびT細胞枯渇哺乳動幹細胞プレパレーションの両者を移植してもよい。特定の例としては、SCID哺乳動物たとえばSCIDマウスからの骨髄およびT細胞枯渇ヒト骨髄プレパレーションの複合移植がある。

M5哺乳動物を得るためには、M1哺乳動物にHV感染肝組織を移植することができる。このようなHV感染肝組織は、HVに感染したM3哺乳動物から、たとえばHV感染ヒト患者からの肝バイオプシーで得られる。さらにHV感染肝組織プレパレーションはまた、非-HV感染M3ドナー哺乳動物から得られた先天的非-HV感染肝組織プレパレーションのインビトロ感染によって得ることもできる。別法として、M1哺乳動物にHV感染肝組織を移植するのではなく、M1哺乳動物にまずHVに感染していない肝組織を移植し、このようにしてM4哺乳動物を得、ついでM4哺乳動物にHVを接種して移植肝組織の感染を導くことも可能である。

M4哺乳動物はしたがって、HVの予防用の薬剤の効果を試験するモデルとして使用できる。このようなモデルでは、予防剤候補物質をHV処置前またはHV処置と同時にM4哺乳動物に投与し、ついでHV感染を阻害するその能力を測定することができる。

ヒト肝組織プレパレーションのほかに、HV感染に感受性の非ヒトM3哺乳動物たとえばチンパンジーまたは他の非ヒト霊長類からの肝組織プレパレーションを用いることも可能である。

本発明の動物モデルはHBVおよびHCV感染症の病理の研究およびその治療法の開発にとくに適している。本発明によるHBVおよびHCV両者のためのモデルは、これらのウイルス感染症には現在、簡単かつ安価なモデルがないことから、とくに好ましい。

本発明はさらにその第二の態様により、薬剤または薬剤の組合せについてHV感染症の治療剤としての可能性を評価する方法において、

(a) 上述のようにM5哺乳動物を得、

(b) 上述の薬剤または薬剤の組合せを上記M5哺乳動物に投与し、ついで

(c) 上記M5哺乳動物においてHV感染の伝播の予防、生理学的症状の減弱または活動的感染の徴候の減弱における上述の薬剤または薬剤の組合せの有効性を評価すること、  
からなる方法を提供する。

本発明はなおさらに、その第三の態様により、薬剤または薬剤の組合せについてHV感染症の予防剤としての可能性を評価する方法において、

(a) 上述のようにM4哺乳動物を得、

(b) 上述の薬剤または薬剤の組合せを上記M4哺乳動物に投与し、

(c) 上記M4哺乳動物にHVを感染させ、ついで

(d) 上記M4哺乳動物の肝組織の一次的HV感染の予防における上述の薬剤または薬剤の組合せの有効性を評価すること、  
からなる方法を提供する。

上述の第二および第三の態様による方法は、その改変によって適宜、治療または予防における上述の薬剤または薬剤の組合せの有効用量の決定に適用することもできる。

その第四の態様により、本発明は、抗-HV免疫細胞または抗体を得る方法において、

(a) 上述の1種または2種以上のM2哺乳動物の少なくとも1種はヒトである、上に定義されたM5哺乳動物を得、

(b) 上記M5哺乳動物の血液から免疫細胞または抗体を回収し、

(c) 抗-HV反応性を有する免疫細胞または抗体を選択すること、  
からなる方法を提供する。

第四の態様においては所望により、M5哺乳動物に、たとえばワクチン接種によって、HVに対する免疫応答を増大させるような処置が行われる。

選択される免疫細胞はHV感染肝細胞に対して反応性の細胞傷害性T細胞であってもよい。このような細胞傷害性T細胞プレパレーションはM5哺乳動物から得られるT細胞系を増殖させ、ついでHV抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性細胞応答を生じる系列を選択することによって得られる。このような細胞傷害

性T細胞プレパレーションは抗-HV療法の枠組みの中でHV患者に注射することができる。

選択された免疫細胞はまた、不死化され抗-HV抗体の産生について選択される抗体産生B細胞であってもよい。これらのB細胞によって産生される抗体はついで、肝炎患者の抗-HV療法において治療剤として使用することができる。

細胞傷害性T細胞系の増殖方法、B細胞系産生のためのB細胞の不死化方法、ならびに所望の反応性を有する細胞を得るための特異的細胞傷害性T細胞または不死化B細胞系の選択方法は一般的にそれ自体既知であり、このような方法の詳細な説明はここでは不要と思われる。

次に本発明を、以下の実施例および添付の図面に記載された一部の特定の実施態様を参照しながら説明する。

#### 図面の説明

図1は、SCID-BNXキメラ動物の腎臓莢膜下への(A)BNXマウス、(B)ルーイスラット、または(C)ヒトからの肝フラグメントの移植後1カ月における、移植肝臓組織の組織像を示す。肝臓組織の腎臓莢膜下移植後も生存した全移植動物でH&E染色を用いた腎臓の光学顕微鏡検査により、移植片の生着について評価した。

図2は、移植30日後の移植ヒト肝フラグメントにおける(A)肝細胞および胆管様構造(矢印で指示)、倍率： $\times 240$ 、(B)肝細胞および上皮細胞、倍率： $\times 1200$ 、(C)胆管様構造、倍率： $\times 1200$ を示す。

図3は(A)移植前における肝セグメントの組織像(H&E染色、 $\times 100$ )、(B)HBV感染ヒト肝臓のHBsAgの免疫組織学的染色( $\times 100$ )、(C)SCID-BNXキメラの腎臓(K)莢膜下に移植されたヒト肝(L)セグメントのグリコゲンの過ヨード酸-シッフ染色( $\times 50$ )、および(D)SCID-BNXキメラの腎臓の莢膜下領域に移植後19日に観察されたHBV感染ヒト肝臓HBsAgの免疫組織学的染色( $\times 50$ )を示す。染色は、一次抗体として、マウス抗-HBsAg(Zymed Lab, San Francisco, CA)を用いて実施した。

図4は、HCV感染ヒト肝臓を腎臓莢膜下に移植したSCID-BNXキメラの血清から抽出し、例3に記載の2セットのプライマーを用いてRT-PCR増

幅に付したRNAサンプルのcDNAの電気泳動像である。各レーンはサンプリングの日に屠殺した異なるマウスを示す。図4の上部に示した最初の13のレーンは、移植後日9のマウスからのサンプルである。残りのレーンは移植後日14~53のサンプルである（レーンの上部に日を指示）。最後の2つのレーンは陰性対照（-）および陽性対照（+）である。

#### 実施例

##### 例1：非HCV患者からのヒト肝臓セグメントの移植

BNXマウス（6~10週齢，雌）はHarlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN) から購入し，CB17/SCIDマウスはAnimal Breeding Center, Weizmann Institute, Rehovot, Israelから購入した。マウスは小ケージに収容し（各ケージ毎に5匹），滅菌した飼料およびシプロフロキサシン（20mg/ml）含有酸性水で飼育した。BNXマウスには移植前12GyのTBIを施し，翌日 $2 \sim 3 \times 10^6$ のT細胞枯渇SCID骨髓細胞で放射線防御を行った。TBIは $\gamma$ 線<sup>150-A<sup>60</sup>Co</sup>光源 (Atomic Energy of Canada, Kanata, Ontario) からF.S.D. 75cm，線量率0.7Gy/分で実施した。SCIDマウス（4~10週齢）から得られた骨髓細胞は以前に報告されたように<sup>(11)</sup>，大豆アグルチニンによる分画凝集によって分画化した（時折認められる「漏出」SCIDマウス中に存在する可能性のあるT細胞除去のため）。骨髓移植の1日後に，ヒト，ラットまたはマウスの肝フラグメントを腎臓莢膜下に移植した。

ラットおよびマウス肝臓組織フラグメントは開腹によって収集し，動物の肝臓から楔状の生検標本を切取り，10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改良イーグル培地またはViaSpan (Belzer UW 溶液 Du Pont Pharmaceuticals, Hertogenbosch, The Netherlands) 中4℃，滅菌条件下に保持した。

ヒト肝臓セグメントは，原発性または二次性肝臓腫瘍のために肝臓の区域切除が行われた場合に入手した。すべての例で，非腫瘍組織は非硬変性であることがヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色によって確認された。肝セグメントは移植前に2時間までUW溶液中に保持させた。肝組織の移植に際してBNXマウスはネンブタールまたはアベルチンで麻酔した。ついで右および左側腹部を約1cm切開して腎臓を露出し，微小鉗子を用い腎臓莢膜下に肝組織（1mm<sup>2</sup>の小

片に切断)を配置した。1本の縫合糸で創傷を閉鎖した。腎臓は付着した移植組織とともに種々の時間間隔(8日~3月)で摘出し、ブーイン液で固定し、パラフィンに包埋し、4 $\mu$ mの切片をH&Eで染色した。

SCID-BNXキメラマウスに移植した肝フラグメントの概要を以下の表1に示す。

表1

マウス数			肝臓源	追跡期間 (週)
移植数	生存数	生着数		
10	9	4	マウス	10
20	12	8	マウス	3
10	7	4	マウス	1.4
10	10	8	ラット	10
20	8	5	ラット	8
20	7	2	ラット	2
10	5	2	ラット	1.4
20	11	5	ヒト	14
20	11	5	ヒト	14
20	11	5	ヒト	12
20	10	2	ヒト	6
20	9	3	ヒト	4
20	16	12	ヒト	2
20	15	14	ヒト	2
16	12	9	ヒト	2

上の表から明らかなように、ヒト肝臓移植片を受容したキメラマウスの生存率は約50~60%のオーダーであった。

移植されたSCID-BNXキメラのこの腎臓莖膜下領域における移植肝フラグメントの組織学的検査から、移植後、典型的な肝細胞構造は消失し、大部分の移植片で中心虚血が起こり、一方、移植片の末梢組織では著しい線維形成を生じることがわかった(図1)。大部分の例で、上皮細胞の増殖(図2)と胆嚢上皮

の形態学的特徴に極めて類似した生着組織（図2Bおよび2C）に加えて肝細胞が認められた。わずかな多形核細胞および形質細胞からなる極めて軽度の炎症反応が時に認められた。

肝生着率の評価では、ヒト肝臓移植片を受容したマウスの33例中15例で12週を越えて移植片は保持され、一方、62例中40例では6週またはそれ未満で安定な生着が見られた（表1）。

#### 例2：B型肝炎ウイルス（HBV）感染ヒトからの肝組織の移植

B型肝炎ウイルス（HBV）感染患者から肝生検標本を得、SCID-BNXキメラマウスの腎臓莢膜下に例1の記載と同様にして移植した。移植前の肝セグメントの免疫組織学的検討では、肝細胞はHBV表面タンパク質（HBsAg）に対して陽性に染色された（図3B）。移植後は、ヒト肝細胞におけるグリコーゲンを確認する過ヨード酸-シッフ反応での染色を用いて、移植細胞のヒト起源の証拠とした（図3C）。移植19日後に、SCID-BNXキメラの腎臓の莢膜下領域を免疫組織学的に染色した。HBsAgは生着組織中の細胞質の個別的領域に検出されたが、隣接するマウス腎細胞には検出されなかった（図3D）。

#### 例3：インビトロでHBVに感染させた肝フラグメントの移植

肝フラグメントは、例1の記載のようにして、非HBV感染ヒトから得た。非感染ヒト肝フラグメントはインビトロでHBVとインキュベートして、それらのHBVによる感染を起こさせた。インビトロでHBVに感染させた肝フラグメントをSCID-BNXマウスの腎臓莢膜下に例1の記載と同様にして移植し、移植マウス中のHBVの検出は、例2の記載と同様の肝細胞の免疫組織学的検討、またはマウスの血清中HBVレベルの以下に示すような逆転写酵素組み込みポリメラーゼチェーン反応（RT-PCR）による試験のいずれかで行った。

RNAを $10\mu\text{l}$ のRNAを含まない水に溶解した。2×Taqポリメラーゼ緩衝液（Promega Corp., Madison, WI），0.5mMのdNTP，20単位のRNAsin（Promega），10mMのジチオスレイトールおよび30単位のトリ骨髄性白血病ウイルス逆転写酵素（Life Sciences, Bethesda, MD）を含有する反応混合物中において42℃で60分間，50ngのアンチセンスプライマーASIを用いcDNAを合成した。PCRは，Taqポリメラーゼ緩衝液（Promega），2mMのdN



TP, 1.5mMのMgCl<sub>2</sub>, 20ngセンスプライマーSIと2.5単位のTaq (Promega) a) を含有する反応混合物50 $\mu$ lの容量中で実施した。反応は、94℃で1.5分、55℃で1.5分および72℃で3分からなるPCR 35サイクルによって実施した。2回目のPCR反応は5 $\mu$ lの最初のPCR反応混合物と組み込んだプライマーSII (センス) およびASI (アンチセンス) のセットにより、前回と同様に実施した。用いた2セットのプライマーは高度に保存された5'非翻訳領域(5'UTR)からの配列である。

以下のプライマーを使用した。

SI 7-26: 5'-CAC-TCC-ACC-ATA-GAT-CAT-CCC-3'.

ASI 248-222: 5'-ACC-ACT-ACT-CGG-CTA-GCA-GT-3'

SII 46-65: 5'-TTC-ACG-CAG-AAA-GCG-TCT-AG-3'.

ASII 190-171: 5'-GTT-GAT-CCA-AGA-AAG-GAC-CC-3'.

結果は以下の表2に示す。

表2-SCID-BNXマウスにおける

インビトロB型肝炎ウイルス感染ヒト肝臓の移植結果

動物数	生存 動物数	生着 動物数	感染経路*	感染指標 および備考**
10	5	5	肝フラグメントの移植前 HBV-DNAとのインビトロイ ンキュベート, +vc sera	PCR+ve(3/5)
10	7	ND***	肝フラグメントの移植前 HBV-DNAとのインビトロイ ンキュベート, +vc sera	日11, PCR+ve 1/7 日30, PCR+ve 4/7
10	5	ND	肝フラグメントの移植前 HBV-DNAとのインビトロイ ンキュベート, +vc sera	日11, PCR+ve 1/5

\* +ve sera = ウイルス血症陽性血清

\*\* PCR +ve=肝炎ウイルスDNAについてPCR試験陽性

\*\*\* ND=データなし。マウスは組織検査用にまだ屠殺されていない。

上の表から明らかなように、移植10日後に移植マウスの一部の血清中にHBV

配列が観察され、移植後の時間の経過とともにHCV配列が観察される移植マウス数は増加した。

例4：HCV感染患者からの肝フラグメントを移植したマウス血清中のHCVの検出

慢性HCV感染症の患者3例からの肝フラグメントを得て、例1の記載のようにして、SCID-BNXマウスの腎臓莢膜下に移植した。移植マウスの血清中におけるHCVの存在およびレベルは、上記例3の記載と同様にして、逆転写酵素組み込みポリメラーゼチェーン反応(RT-PCR)によって評価した。

HCV感染肝フラグメントの移植後に得られた結果は以下の表3に示す。

表3-HCV感染ヒト患者からの肝フラグメントの  
SCID-BNXマウスへの移植結果

HCV感染肝フラグメント 移植数	マウス数		
	生存数	安定な生着 数	ウイルス血症 陽性数
20	17	15	8
17	14	10	7
13	11	6	5
12	10	ND*	6

\*ND=データなし。マウスは組織検査用にまだ屠殺されていない。

HCV配列は移植後2週に初めて移植マウスの血清中に観察され、マウスが屠殺された移植約2カ月後まで間欠的に検出が続いた(代表的な実験結果を図4に示す)。HCV RNAの検出における類似の変動は、HCVを実験的に感染させたチンパンジーおよび慢性感染患者においても以前に観察されていて、多分、血清中の極めて低レベルのウイルスによる結果と考えられる。

例5：インビトロでHCVに感染させた肝フラグメントの、C3Hマウスへの移植

免疫欠損株ではないC3Hマウスを分割全身照射(TBI)(1回目の用量：400rad, 2回目の用量：1,200rad)によって放射線照射し、翌日、 $3 \times 10^6$ のSCID骨髓細胞で放射線防御を行った(上記例1と同様)。

肝フラグメントは、例1の記載のようにして、非HCV感染ヒトから得、この非感染ヒト肝フラグメントをインビトロでHCVとインキュベートして、HCV感染を起こさせた。インビトロでHCVに感染させた肝フラグメントを、C3Hマウスの腎臓莢膜下に上述の記載と同様にして移植し、移植マウスのHCVの検出はマウス血清中のHCVレベルを、上記例3の記載と同様に、RT-PCRによって試験して実施した。

結果は以下の表4に示す。

表4-C3Hマウスにおける

インビトロC型肝炎ウイルス感染ヒト肝臓の移植結果

動物数	生存 動物数	生着 動物数	感染経路*	感染指標 および備考**
10	10	ND*	肝フラグメントの移植前 HCV-DNAとのインビトロイ ンキュベート、+HCV sera**	日14, PCR +HCV 2/10

\* ND=データなし。マウスは組織検査用にまだ屠殺されていない。

\*\* +HCV 血清=HCV陽性血清

\*\*\* PCR +HCV = C型肝炎ウイルスDNAについてPCR試験陽性

上の表に示した結果は、第一にインビトロでHCVに感染させたヒト肝フラグメントは生着可能で、移植マウスの血清中におけるHCV配列の検出で評価して移植マウスにHCV感染を生じたことを示している。

それに加えて、上記の結果は、免疫欠損株ではないC3Hマウスの腎臓莢膜下にヒトHCV感染肝臓を移植できることを最初に示したものである。

【図1A】



FIG. 1A

【図1B】



FIG. 1B

【図1C】



FIG. 1C

【図2】

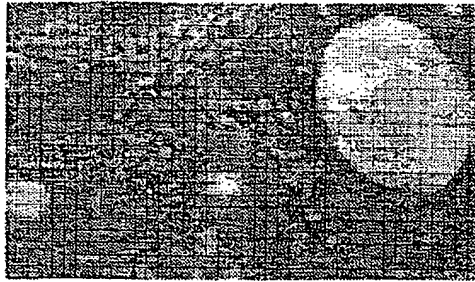


FIG. 2A

【図2】

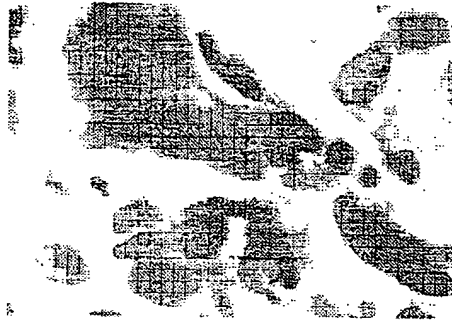


FIG. 2B

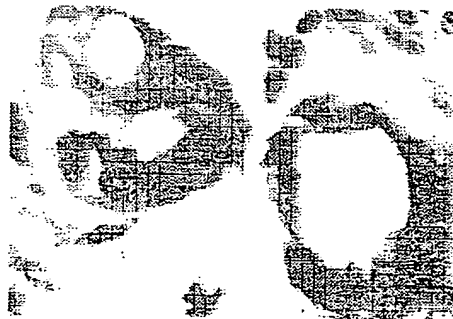


FIG. 2C

【図3】

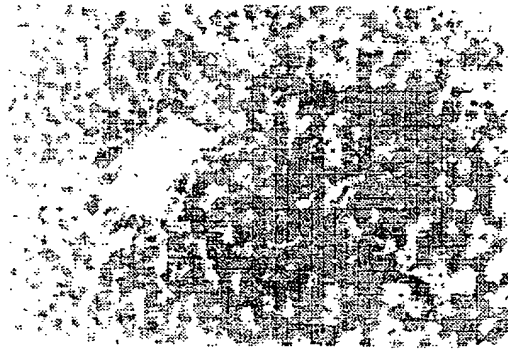


FIG. 3A

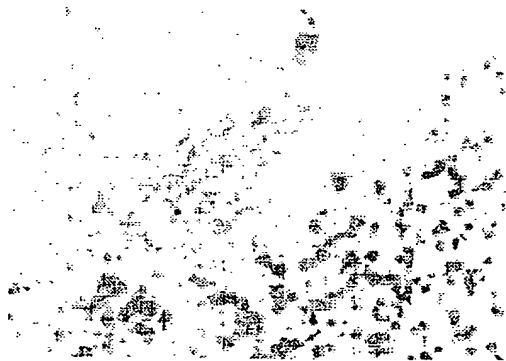


FIG. 3B

【図3】

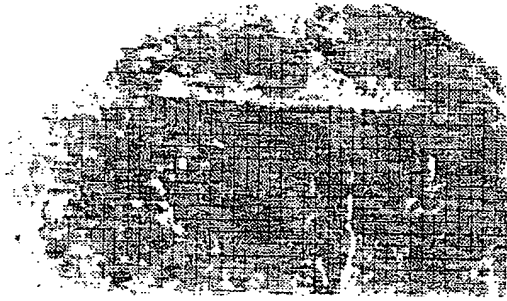


FIG. 3C

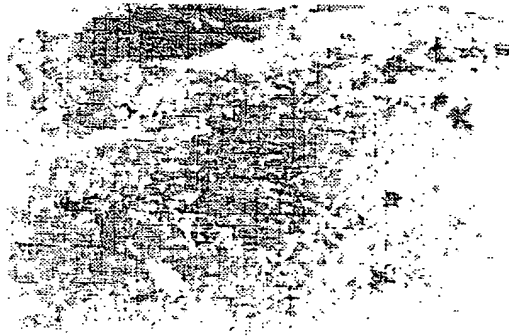


FIG. 3D

【図4】

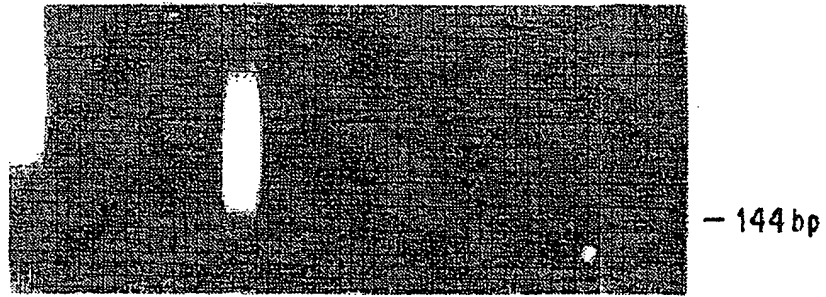


FIG. 4A

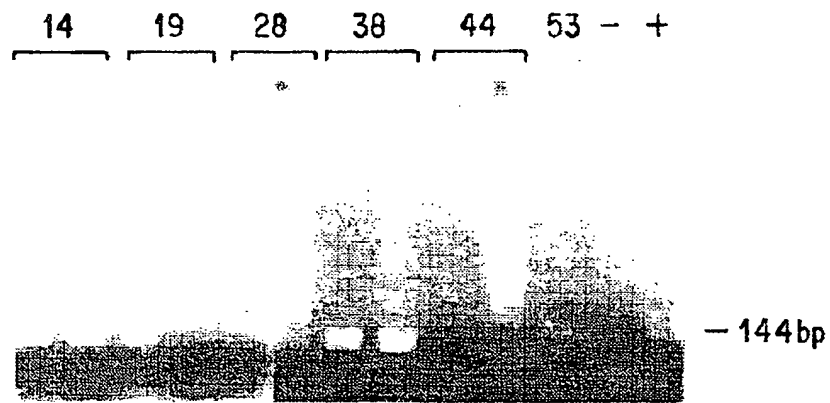


FIG. 4B



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. <b>PCT/US 94/05410</b>		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 5 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 517 199 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY, LTD.) 9 December 1992 cited in the application see column, 6, lines 33-43; Example 3	1-7, 11, 12, 14, 17-19
Y	see column 2, lines 25-54	1-7, 11-20, 22, 24
Y	EP,A,0 438 053 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY, LTD.) 24 July 1991 cited in the application see pages 7-11	1-7, 11-20, 22, 24
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 1995		Date of mailing of the international search report 11.05.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Alt, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 94/05410

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol.252, 19 April 1991 pages 427 - 431 LUBIN, I. ET AL. 'Engraftment and development of human T and B cells in mice after bone marrow transplantation' see whole document ---	1-7, 11-20, 22,24
X	PROC.NATL.ACAD.SCI., vol.90, July 1993, USA pages 6037 - 6041 SHIMIZU, Y. ET AL. 'Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro' cited in the application see "Materials and Methods", paragraph "Virus"; page 6038, lines 10-15 ---	21,23,25
A	PROC.NATL.ACAD.SCI., vol.83, June 1986, USA pages 4529 - 4532 NAKAMURA, T. ET AL. 'Successful liver allografts in mice by combination with allogeneic bone marrow transplantation' cited in the application ---	1
A	EP,A,0 469 632 (SYSTEMIX, INC.) 5 February 1992 ---	1
A	ADVANCES IN IMMUNOLOGY, vol.50, 1991 pages 303 - 325 MOSIER, D.E. 'Adoptive Transfer of Human Lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis and AIDS' ---	1
P,X	HEPATOLOGY, vol.20, no.4/2, 1994 page 232A GALUN, E. ET AL. 'Hepatitis C viremia in chimeric mice' 45th Annual Meeting of the American association for the study of liver diseases, November 11-15, 1994 see abstract ---	1-25
P,A	BLOOD, vol.83, no.8, 1994 pages 2368 - 2381 LUBIN, I. ET AL. 'Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice' -----	8-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 94/05410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0517199	09-12-92	NONE	
EP-A-0438053	24-07-91	JP-A- 4267830	24-09-92
EP-A-0469632	05-02-92	AU-B- 646680	03-03-94
		AU-A- 8158691	19-12-91
		CA-A- 2048406	04-02-92
		JP-A- 4252128	08-09-92

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	弁内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/576		9284-4C	A 6 1 K 39/395	D
// A 6 1 K 39/395		9281-4B	C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KG, KR, K Z, LK, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, UA, UZ, VN

【要約の続き】



FIG. 1C



FIG. 1B

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成10年(1998)5月12日

【公表番号】特表平8-511937  
 【公表日】平成8年(1996)12月17日  
 【年通号数】  
 【出願番号】特願平7-500728  
 【国際特許分類第6版】

A01K 67/027  
 C07K 16/10  
 C12N 5/06  
 G01N 33/531  
 33/576

// A61K 39/395

【F1】

A01K 67/027  
 C07K 16/10  
 G01N 33/531 A  
 33/576 B  
 Z  
 A61K 39/395 D  
 C12N 5/00 E

手続補正書



平成9年10月23日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成7年特許第500728号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 イニダ リサーチ アンド デベロップメント  
 カンパニー リミテッド

3. 代理人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
 新大塚ビルディング531  
 電話 (3211) 3651 (代表)  
 氏 名 (6663) 池田 幸子 〇印



4. 補正対象項目

明 細 書

5. 補正対象項目名

明 細 書

6. 補正の内容 別紙のとおり

1. 明細書を以下の通りに補正する。

(1) 明細書第11頁第20行から第12頁第13行の「移植マウス中のHIVの検出は、……結果は以下の表2に示す。」を「移植マウス中のHBVの検出は、例2の記載と同様の所細胞の免疫組織学的検討、またはマウスの血清中HBVレベルのPCRによる試験のいずれかでを行った。結果は以下の表2に示す。」に補正する。

(2) 同第13頁第6行から第8行の「移植マウスの血清中におけるHCVの存在およびレベルは、上段落3の記載と同様にして逆転写増幅増込みポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって評価した。」を「移植マウスの血清中におけるHCVの存在およびレベルは、以下に示す逆転写増幅増込みポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって評価した。」に補正する。

RNAを10μlのRNAを含まない水に溶解した。2×Taq ポリメラーゼ新合成 (Promega Corp., Madison, WI), 0.5 mMのdNTP, 20単位のRNAasin (Promega), 10mMのジチオスレイトールおよび30 単位トリ骨髄性白血病ウイルス逆転写酵素(Life Sciences, Bethesda, MD)を含有する反応混合物中において42℃で50分間、50 ng のアンチセンスプライマーS1を用いてcDNAを合成した。PCRは、Taq ポリメラーゼ新合成 (Promega), 2 mMのdNTP, 1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>, 20 ng センズプライマーS1と2.5 単位のTaq (Promega)を含有する反応混合物 50 μlの容量中で実施した。反応は、94℃で1.5 分、55℃で1.5 分および72℃で2 分からなるPCR30サイクルによって実施した。2 回目的PCR反応は5 μlの最初のPCR反応混合物と組み込んだプライマーS2 (センス) およびAS2 (アンチセンス) のセットにより、前記と同様に実施した。用いた2セットのプライマーは当座に保存された5'非翻訳領域(5'UTR)からの配列である。

以下のプライマーを低圧した。

S1 7-26: 5'-CAC-TCC-ACC-ATA-GAT-CAT-GCC-3',  
 AS1 248-222: 5'-ACC-ACT-ACT-CGG-CTA-GCA-GT-3',  
 S2 44-43: 5'-TTC-ACG-CAG-AAA-GCG-TCT-AG-3',  
 AS2 186-171: 5'-GTT-GAT-CCA-AGA-AAG-GAC-CC-3'。に補正す

特表平8-511937

る。

(3) 同第14页第5行の「上記例3」を「上記例4」に修正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**